Agilent 1100 シリーズ分取システムを用いたフラクションコレクション

内容：

- *ディレイタイム / ボリュームの取り扱い*
- *検出器のディレイ*
- *フラクションコレクションの最適化*
- *制限事項、および問題発生の防止策*

ディレイタイムとディレイボリュームの取り扱い

図 1 に示すのは Agilent 1100 シリーズ分取システムのフラクションコレクション部分の概念図です。この部分には 2 種類のディレイボリューム（V_{D1}、V_{D2}）が設定されています。ピークを基準として分画コレクションする場合のシステムディレイタイム t_{D1} と t_{D2} はディレイボリュームを流量 $\dot{v}$ で割ることによって得られます。

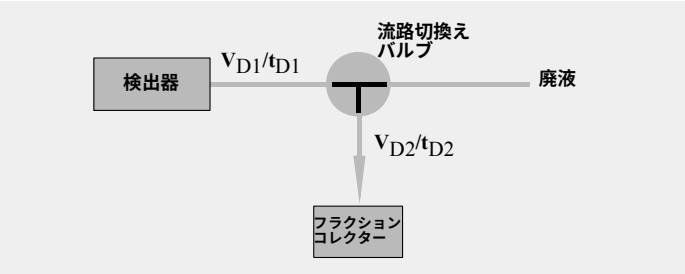

図 1 Agilent 1100 シリーズ フラクションコレクター概念図

ディレイボリューム V_{D2} はシステム定数であり、AS および PS フラクションコレクターについてそれぞれ 23 µl および 120 µl と設定されています。*Fraction Collector Configuration* ウィンドウに表示されるディレイボリューム V_{D1} はケミステーションソフトウェアの *Delay Volum Calibration* 機能を使用して決定します。

分取実行中にピークが検出されると（図 2）、次に示すディレイボリュームの計算にしたがって流路切換えバルブが動作します。

フラクションコレクション開始： $t = t_0 + t_{D1}$
フラクションコレクション終了： $t = t_E + t_{D1} + t_{D2}$

Agilent Technologies

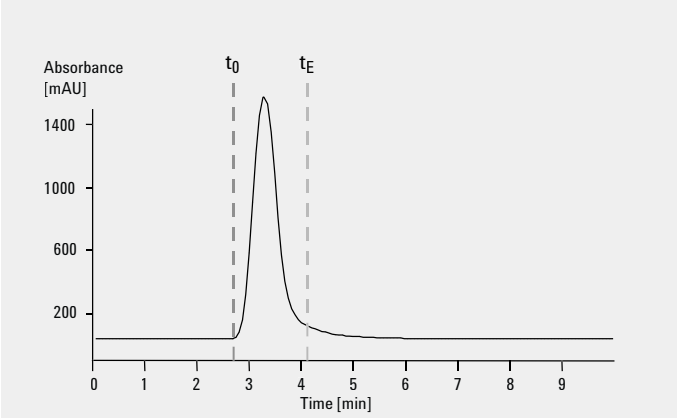

図 2　クロマトグラムとピークの開始（t_0）と終了（t_E）時間

検出器信号の遅延

フラクションタイミングの発生に使用するすべての Agilent UV 検出器の内部では生データのフィルタ処理に由来する信号遅延が発生します。信号遅延の大きさは検出器の *ピーク幅（Peakwidth）* 設定によって変わりますが、流路切換えバルブにはこの要素を考慮に入れたタイミングでトリガー信号が送られます。異なる *ピーク幅（Peakwidth）* に対応する内部信号ディレイタイムを表 1 および表 2 に示します。

表 1　DAD/MWD

ピーク幅 (min)	応答時間 (sec)	信号遅延 (sec)
<0.01	0.1	0.05
>0.01	0.2	0.15
>0.03	0.5	0.5
>0.05	1.0	1.25
>0.10	2.0	2.75
>0.20	4.0	5.9
>0.40	8.0	11.9
>0.85	16.0	23.9

表 2　VWD

ピーク幅 (min)	応答時間 (sec)	信号遅延 (sec)
<0.005	<0.1	0.07
>0.005	0.12	0.14
>0.01	0.25	0.29
>0.025	0.5	0.58
>0.05	1	1.31
>0.1	2	2.84
>0.02	4	5.97
>0.4	8	12.3

内部信号遅延がディレイタイム t_{D1} よりも長くなった場合は一部のピークを見失う可能性があります。許容できる最長の信号ディレイタイムは次式から計算されます。

$$\text{信号ディレイタイム}_{(\text{最大})} = \frac{V_{D1}}{\dot{v}} \qquad \dot{v} = \text{流量}$$

最大信号ディレイタイムが計算されたならば、その計算値よりも短い信号ディレイタイムを与える *ピーク幅（Peakwidth）* 設定を選択します。こうして得られた *Peakwidth* を使用して分取を実行します。

注 意

- *Peakwidth* の値として、DAD と MWD を使用する場合は常に > 0.01、VWD を使用する場合は常に > 0.005 となるように設定することを推奨します。
- *Peakwidth* 設定をより短くすることが難しく、かつ信号遅延が t_{Dl} よりも長くなってしまう場合には追加配管を挿入して V_{Dl} を大きくするという方法もあります。ただし、ディレイボリュームの増大はピークの広がりを招きますから、一般的にはこの手法はお奨めできません。
- ケミステーションで設定するランの停止時間は少なくとも以下の条件を満たす必要があります：

  タイムテーブルの全持続時間（最後の *Off* エントリの時間）＋フラクションコレクターのディレイタイム
  $(V_{D1}/\dot{v}) + 0.1\text{min}$

  直前のピークの終了時間（t_E）＋フラクションコレクターのディレイタイム $(V_{D1}/\dot{v}) + 0.1\text{min}$

フラクションコレクションの最適化規則

時間ベースフラクションコレクション

- *時間スライス* は少なくとも 0.05 分よりも長くする必要があります。
- 1 フラクションの長さが少なくとも 0.05 分以上となるように *フランクション番号* を設定してください。

ピークベースのフラクションコレクション

- 1 フラクションの長さが少なくとも 0.05 分以上となるようにしきい値とスロープの値を設定してください。
- しきい値ベースのフラクションコレクションを実行できるのは *Peak Detectors* テーブルから *Up Slope* と *Down Slope* の値を取り除いた場合に限られます。
- 非分離ピークであってもしきい値とスロープ値を適切に選択すれば分離できることがあります。分離されない 2 つのピークを 1 つのフラクションとしてコレクションしたい場合は、しきい値のみを使用してください。
- 検出器信号が飽和する場合はしきい値だけを使用してコレクションしてください。通常、ピーク頂上部の信号は多くのノイズを含んでいますから、スロープ値を定義すると飽和ピーク頂上でコレクションの開始 / 終了信号を検出してしまいます。
  しきい値とスロープの両方を使用してコレクションを行いたい場合はより光路長の短いセルに交換してください。
- クロマトグラムのベースラインが 0 mAU の上下に振れていたとしても、しきい値を基準とするピークトリガではこのオフセットは考慮されません。しきい値は常に 0 mAU に加算されます。

制限事項および問題発生の防止策

フラクション コレクション ニードルの洗浄

*ニードル洗浄（Rinse Fraction Collection Needle）をコレクションとコレクションの間（Between fraction collection）*に設定した場合は、この処理の実行のために少なくとも 0.1 分が必要です。
時間ベースでのフラクションコレクションでニードル洗浄を実行できるのはタイムテーブルのエントリとエントリの間だけです。このためにはエントリ間に少なくとも 0.1 分の時間間隔が必要です。
ピークベースでフラクションコレクションを行う場合にも最短で 0.1 分の時間間隔が必要となります。洗浄中に新しいピークが検出されると、洗浄が中断されてニードルは次のフラクション位置へ戻ります。流量とディレイボリューム V_{Dl} の設定によってはこのピークの開始位置を見過ごす可能性があります。

ニードル移動

フラクション コレクター設定の *Needle Movement* メニューに含まれる *into location* オプションを使用できるのはキャップ付き 2、5 ml バイアルまたはウェルプレートを使用する場合だけです。それ以外の容量や口の開いたバイアルにこのコマンドを使用すると *Movement failed* エラーが発生します。

フラクション 容器の交換

フラクション コレクターからコレクション液の入ったチューブやバイアル、ウェルプレートを取り出して交換するときは必ず一旦トレイ全体を取り出してから再挿入してください。トレイ全体の入替えを行わないと、フラクション コレクターはフラクション容器が一旦空になったことを認識しません。

リカバリー位置

リカバリー位置として使用できるのはファネルトレイ（G1364-84502）のファネルだけです。
ファネルトレイ上にウェルプレートが設定されている場合、ファネルはリカバリー位置としてのみ使用することができます。すなわち、ファネルをフラクション位置として使用するためにはファネルトレイ上にウェルプレートを設定することはできません。リカバリー位置からフラクション容器へのニードル移動には約 0.07 分かかります。
流路切換えバルブはニードルが移動している間廃液位置に切り換わっていますから、この間のカラムからの流出物はすべて失われます。

プーリング

フラクションをプーリングするときは、フラクション容器を追加することができません。ユーザーの責任において、全プーリング操作実行中に容器のフラクション容量の不足が生じないようにする必要があります。フラクション位置が満杯になるとポンプ電源が自動的に切れます。

携帯コントロール モジュール

携帯コントロール モジュールは複数のフラクション コレクターをサポートしません。携帯コントロール モジュールを使用するときにシステムに設定できるフラクション コレクターは 1 つに限られます。

© Copyright Agilent Technologies 2001
Printed in Japan 02/02
Part Number G2262-96002

G2262-96002